

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. Mai 2003 (01.05.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/035868 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁵: C12N 15/11, 95466 Weidenberg (DE), VORNLOCHER, Hans-Peter [DE/DE]; Lise-Meitner-Platz 4, 95448 Bayreuth (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/11968 (74) Anwalt: GASSNER Wolfgang; Nügelsbachstr. 49 A, 91052 Erlangen (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum: 25. Oktober 2002 (25.10.2002) (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK, SI, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 55 280.7 26. Oktober 2001 (26.10.2001) DE
101 58 411.3 29. November 2001 (29.11.2001) DE
101 60 151.4 7. Dezember 2001 (07.12.2001) DE
PCT/EP02/00151 9. Januar 2002 (09.01.2002) EP
PCT/EP02/00152 9. Januar 2002 (09.01.2002) EP
102 30 997.3 9. Juli 2002 (09.07.2002) DE

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), curasaurisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): RIBOPHARMA AG [DE/DE]; Fritz-Hornschuch-Straße 9, 95326 Kulmbach (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WAJANT, Harald [DE/DE]; Sonnenbühl 2, 70771 Leinenfeld-Echtingen (DE); PFIZENMAIER, Klaus [DE/DE]; Seehausstr. 7, 75233 Tiefenbronn (DE). LIMMER, Stefan [DE/DE]; Gutenbergstr. 9, 95512 Neudrossenfeld (DE). KREUTZER, Roland [DE/DE]; Glotzdorf 26,

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht
— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

A1 (54) Title: MEDICAMENT THAT INCREASES THE EFFECTIVENESS OF A DRUG THAT INDUCES RECEPTOR-MEDIATED APOPTOSIS IN TUMOR CELLS

WO 03/035868 (54) Bezeichnung: MEDIKAMENT ZUR ERHÖHUNG DER WIRKSAMKEIT EINES REZEPTOR-VERMITTELTER APOPTOSE IN TUMORZELLEN AUSLÖSENDEN ARZNEIMITELS

(57) Abstract: The invention relates to a medicament that increases the effectiveness of a drug that induces receptor-mediated apoptosis in tumor cells. The inventive medicament contains a double-stranded ribonucleic acid (dsRNA) that is suitable to inhibit the expression of a c-FLIP gene.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Medikament zur Erhöhung der Wirksamkeit eines Rezeptor-vermittelt Apoptose in Tumorzellen auslösenden Arzneimittels, wobei das Medikament eine zu einer Hemmung der Expression eines c-FLIP-Gens geeignete doppelseitige Ribonukleinsäure (dsRNA) enthält.

Medikament zur Erhöhung der Wirksamkeit eines Rezeptor-vermittelt Apoptose in Tumorzellen auslösenden Arzneimittels

Die Erfindung betrifft ein Medikament und eine Verwendung zur
5 Erhöhung der Wirksamkeit eines Rezeptor-vermittelt Apoptose
in Tumorzellen auslösenden Arzneimittels. Die Erfindung be-
trifft weiterhin eine Verwendung zur Herstellung eines sol-
chen Medikaments, ein Verfahren zur Erhöhung der Wirksamkeit
eines Rezeptor-vermittelt Apoptose in Tumorzellen auslösenden
10 Wirkstoffs und eine doppelsträngige Ribonukleinsäure.

Aus der DE 101 00 586 C1 ist ein Verfahren zur Hemmung der
Expression eines Zielgens in einer Zelle bekannt, bei dem ein
15 Oligoribonukleotid mit doppelsträngiger Struktur in die Zelle
eingeführt wird. Ein Strang der doppelsträngigen Struktur ist
dabei komplementär zum Zielgen. Das der Hemmung zu Grunde
liegende Prinzip wird inzwischen als RNA-Interferenz bezeich-
net.

20 Ein bekannter Apoptose auslösender Wirkstoff ist der Tumor
Nekrose Faktor-verwandte Apoptose auslösende Ligand TRAIL.
TRAIL bewirkt durch Bindung an TRAIL-R1 und TRAIL-R2, zwei
eine Todesdomäne enthaltende Mitglieder der TNF-Rezeptor Su-
perfamilie, eine Aktivierung einer Caspase und löst dadurch
25 Apoptose in Tumorzellen aus.

Aus Yeh, W.-C. et al., Immunity 12 (2000), Seiten 633 bis 642
ist es bekannt, dass embryonale Fibroblasten aus der Maus,
denen das zelluläre FLICE-Inhibitorprotein (c-FLIP) fehlt,
30 besonders sensitiv gegenüber Rezeptor-vermittelter Apoptose
sind. Bei diesen Zellen handelte es sich jedoch nicht um Tu-
morzellen.

Es sind mehrere Spleiß-Varianten von c-FLIP bekannt, unter
35 anderem eine kurze Spleiß-Variante c-FLIP-S und eine lange
Spleiß-Variante c-FLIP-L.

Aus Bin, L. et al., FEBS Lett 510 (1-2) (2002), Seiten 37 bis 40 ist es bekannt, dass c-FLIP-defiziente embryonalen Mausfibroblasten durch retroviral vermittelte Transduktion von c-
5 FLIP-S resistent gegenüber TRAIL induzierter Apoptose werden.

Tumorzellen sind häufig nicht oder kaum empfindlich gegenüber Apoptose auslösenden Arzneimitteln bzw. Wirkstoffen. Die Behandlung mit solchen Arzneimitteln erfordert daher häufig eine Co-Behandlung durch Bestrahlung oder Chemotherapie, um eine 10 therapeutische Wirkung des Apoptose auslösenden Arzneimittels zu erreichen. Die genannten Co-Behandlungen gehen jedoch mit starken Nebenwirkungen einher.

15 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Insbesondere soll ein Medikament, eine doppelsträngige Ribonukleinsäure und eine Verwendung zur Erhöhung der Wirksamkeit eines Apoptose in Tumorzellen auslösenden Arzneimittels bereitgestellt werden, 20 welches die oben genannten starken Nebenwirkungen vermeidet. Weiterhin soll eine Verwendung zur Herstellung eines solchen Medikaments und ein Verfahren zur Erhöhung der Wirksamkeit eines Apoptose in Tumorzellen auslösenden Wirkstoffs bereitgestellt werden.

25 Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1, 17, 18, 34 und 47 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 16, 19 bis 33, 35 bis 46 und 48 bis 60.

30 Erfindungsgemäß ist ein Medikament zur Erhöhung der Wirksamkeit eines Rezeptor-vermittelt Apoptose in Tumorzellen auslösenden Arzneimittels vorgesehen, wobei das Medikament eine zu einer Hemmung der Expression eines c-FLIP-Gens mittels RNA-35 Interferenz geeignete doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) enthält. Eine dsRNA liegt vor, wenn die aus einem

oder zwei Ribonukleinsäure-Strängen bestehende Ribonuklein-säure eine doppelsträngige Struktur aufweist. Nicht alle Nu-kleotide der dsRNA müssen kanonische Watson-Crick-Basen-paarungen aufweisen. Insbesondere einzelne nicht komplementä-
5 re Basenpaare beeinträchtigen die Wirksamkeit kaum oder gar nicht. Die maximal mögliche Zahl der Basenpaare ist die Zahl der Nukleotide in dem kürzesten in der dsRNA enthaltenen Strang.

10 Das Medikament kann die dsRNA in einer zu der Hemmung der Ex-pression des c-FLIP-Gens in den Tumorzellen ausreichenden Menge enthalten. Das Medikament kann auch so konzipiert sein, dass mehrere Einheiten des Medikaments zusammen die ausrei-chende Menge in der Summe enthalten. Die ausreichende Menge
15 hängt von der Verabreichungsform ab. Zur Ermittlung einer ausreichenden Menge kann die dsRNA in steigenden Mengen bzw. Dosierungen verabreicht werden. Danach kann an einer aus dem Tumor entnommenen Gewebeprobe mit bekannten Methoden ermit-telt werden, ob bei dieser Menge eine Hemmung der Expression
20 des c-FLIP-Gens eingetreten ist. Bei den Methoden kann es sich z.B. um molekularbiologische, biochemische oder immuno-logische Methoden handeln.

Überraschenderweise hat es sich gezeigt, dass die gezielte
25 und ausschließliche Hemmung der Expression von c-FLIP durch RNA-Interferenz ausreichend ist, um Tumorzellen für eine Re-zzeptor-vermittelte Auslösung einer Apoptose empfänglich bzw. sensiv zu machen. Das Medikament ermöglicht dadurch eine gezielte und nebenwirkungsarme bzw. nebenwirkungsschwache Be-handlung von Tumoren mit spezifisch die Apoptose von Tumor-
30 zellen auslösenden Arzneimitteln.

Vorzugsweise löst das Arzneimittel Apoptose mittels Tumor Nekrose Faktor oder Tumor Nekrose Faktor-verwandten Apoptose
35 auslösenden Liganden, insbesondere TRAIL, aus. Die Wirksam-

keit eines solchen Arzneimittels kann besonders effektiv durch das erfindungsgemäße Verfahren gesteigert werden.

Vorzugsweise weist ein Strang S1 der dsRNA einen zum c-FLIP-Gen zumindest abschnittsweise komplementären, insbesondere aus weniger als 25 aufeinanderfolgenden Nukleotiden bestehenden, Bereich auf. Unter dem "c-FLIP-Gen" wird der DNA-Strang der doppelsträngigen für c-FLIP kodierenden DNA in der Tumorzelle verstanden, welcher komplementär zu einem bei der Transkription als Matrize dienenden DNA-Strang einschließlich aller transkribierten Bereiche ist. Bei dem c-FLIP-Gen handelt es sich also im allgemeinen um den Sinn-Strang. Der Strang S1 kann somit komplementär zu einem bei der Expression des c-FLIP-Gens gebildeten RNA-Transkript oder dessen Prozessierungsprodukt, wie z.B. einer mRNA, sein. Es kann z.B. ausreichend sein, wenn der Strang S1 komplementär zu einem Teil des 3'-untranslatierten Bereichs der mRNA ist.

Der komplementäre Bereich der dsRNA kann 19 bis 24, bevorzugt 20 bis 24, besonders bevorzugt 21 bis 23, insbesondere 22 oder 23, Nukleotide aufweisen. Eine dsRNA mit dieser Struktur ist besonders effizient in der Inhibition des c-FLIP-Gens. Der Strang S1 der dsRNA kann weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, insbesondere 23, Nukleotide aufweisen. Die Zahl dieser Nukleotide ist zugleich die Zahl der in der dsRNA maximal möglichen Basenpaare.

Als besonders vorteilhaft hat es sich erwiesen, wenn zumindest ein Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist. Eine solche dsRNA weist gegenüber einer dsRNA ohne einzelsträngige Überhänge an mindestens einem Ende eine bessere Wirksamkeit bei der Hemmung der Expression des c-FLIP-Gens auf. Ein Ende ist dabei ein Bereich der dsRNA, in welchem ein 5'- und ein 3'-Strangende vorliegen. Eine nur aus

dem Strang S1 bestehende dsRNA weist demnach eine Schleifenstruktur und nur ein Ende auf. Eine aus dem Strang S1 und einem Strang S2 gebildete dsRNA weist zwei Enden auf. Ein Ende wird dabei jeweils von einem auf dem Strang S1 und einem auf dem Strang S2 liegenden Strangende gebildet.

Vorzugsweise befindet sich der einzelsträngige Überhang am 3'-Ende des Strangs S1. Diese Lokalisation des einzelsträngigen Überhangs führt zu einer weiteren Steigerung der Effizienz des Medikaments. Die dsRNA kann auch nur an einem, insbesondere dem am 3'-Ende des Strangs S1 gelegenen, Ende einen einzelsträngigen Überhang aufweisen. Das andere Ende ist bei einer zwei Enden aufweisenden dsRNA glatt, d.h. ohne Überhänge, ausgebildet. Überraschenderweise hat es sich gezeigt, dass zur Verstärkung der Interferenz-Wirkung der dsRNA ein Überhang an einem Ende der dsRNA ausreichend ist, ohne dabei die Stabilität in einem solchen Maße zu erniedrigen wie durch zwei Überhänge. Eine dsRNA mit nur einem Überhang hat sich sowohl in verschiedenen Zellkulturmedien als auch in Blut, Serum und Zellen als hinreichend beständig und besonders Wirksam erwiesen.

Vorzugsweise weist die dsRNA neben dem Strang S1 einen Strang S2 auf, d.h. sie ist aus zwei Einzelsträngen gebildet. Besonders wirksam ist das Medikament, wenn der Strang S1 (Antisinn-Strang) eine Länge von 23 Nukleotiden, der Strang S2 eine Länge von 21 Nukleotiden und das 3'-Ende des Strangs S1 einen aus zwei Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist. Das am 5'-Ende des Strangs S1 gelegene Ende der dsRNA ist dabei glatt ausgebildet. Der Strang S1 kann zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des c-FLIP-Gens komplementär sein. Vorzugsweise besteht die dsRNA aus dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 3 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 4

oder dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 7 oder dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 3 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 8 gemäß dem anliegenden Sequenzprotokoll. Eine solche dsRNA ist in der Hemmung der Expression des c-FLIP-Gens besonders wirksam.

Die dsRNA kann in dem Medikament in einer Lösung, insbesondere einem physiologisch verträglichen Puffer oder einer physiologischen Kochsalzlösung, von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Kapsid, einem Kapsoid oder einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel umschlossen oder an einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel gebunden vorliegen. Der physiologisch verträgliche Puffer kann eine phosphatgepufferte Salzlösung sein. Eine micellare Struktur, ein Kapsid, ein Kapsoid oder eine polymere Nano- oder Mikrokapsel kann die Aufnahme der dsRNA in die Tumorzellen erleichtern. Die polymere Nano- oder Mikrokapsel besteht aus mindestens einem biologisch abbaubaren Polymer, z.B. Polybutylcyanoacrylat. Die polymere Nano- oder Mikrokapsel kann darin enthaltene oder daran gebundene dsRNA im Körper transportieren und freisetzen.

Die dsRNA kann oral, mittels Inhalation, Infusion oder Injektion, insbesondere intravenöser, intraperitonealer oder intratumoraler Infusion oder Injektion, verabreicht werden. Das Medikament kann daher eine Zubereitung aufweisen, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion oder Injektion, insbesondere zur intravenösen, intraperitonealen oder intratumoralen Infusion oder Injektion, geeignet ist. Eine zur Inhalation, Infusion oder Injektion geeignete Zubereitung kann im einfachsten Fall aus einem physiologisch verträglichen Lösungsmittel, vorzugsweise einer physiologischen Kochsalzlösung oder einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, und der dsRNA bestehen. Es hat sich nämlich überraschenderweise herausgestellt, dass

eine lediglich in einem solchen Puffer oder einem solchen Lösungsmittel gelöste und verabreichte dsRNA von den Tumorzellen aufgenommen wird und die Expression des c-FLIP-Gens hemmt, ohne dass die dsRNA dazu in einem besonderen Vehikel verpackt sein muss.

Vorzugsweise liegt das Medikament in mindestens einer Verabreichungseinheit vor, welche die dsRNA in einer Menge enthält, die eine Dosierung von höchstens 5 mg, insbesondere höchstens 2,5 mg, bevorzugt höchstens 200 µg, besonders bevorzugt höchstens 100 µg, vorzugsweise höchstens 50 µg, insbesondere höchstens 25 µg, pro kg Körpergewicht und Tag ermöglicht. Es hat es sich nämlich gezeigt, dass die dsRNA bereits in dieser Dosierung eine ausgezeichnete Effektivität in der Hemmung der Expression des c-FLIP-Gens aufweist. Die Verabreichungseinheit kann für eine einmalige Verabreichung bzw. Einnahme pro Tag konzipiert sein. Dann ist die gesamte Tagesdosis in einer Verabreichungseinheit enthalten. Ist die Verabreichungseinheit für eine mehrmalige Verabreichung bzw. Einnahme pro Tag konzipiert, so ist die dsRNA darin in einer entsprechend geringeren das Erreichen der Tagesdosis ermöglichen Menge enthalten. Die Verabreichungseinheit kann auch für eine einzige Verabreichung bzw. Einnahme für mehrere Tage konzipiert sein, z. B. indem die dsRNA über mehrere Tage freigesetzt wird. Die Verabreichungseinheit enthält dann ein entsprechend Mehrfaches der Tagesdosis.

Erfindungsgemäß ist weiterhin die Verwendung einer zur Hemmung der Expression eines c-FLIP-Gens mittels RNA-Interferenz geeigneten doppelsträngigen Ribonukleinsäure zur Herstellung eines Medikaments zur Erhöhung der Wirksamkeit eines Rezeptor-vermittelt Apoptose in Tumorzellen auslösenden Arzneimittels vorgesehen. Weiterhin ist erfundungsgemäß die Verwendung einer zur Hemmung der Expression eines c-FLIP-Gens mittels RNA-Interferenz geeigneten doppelsträngigen Ribonukleinsäure

zur Erhöhung der Wirksamkeit eines Rezeptor-vermittelt Apoptose in Tumorzellen auslösenden Arzneimittels vorgesehen.

Darüber hinaus ist ein Verfahren zur Erhöhung der Wirksamkeit eines Rezeptor-vermittelt Apoptose in einer Tumorzelle auslösenden Wirkstoffs vorgesehen, wobei eine zu einer Hemmung der Expression eines c-FLIP-Gens mittels RNA-Interferenz geeignete doppelsträngige Ribonukleinsäure in die Tumorzelle eingeführt wird. Unter "eingeführt werden" wird das Aufnehmen in die Zelle verstanden. Das Aufnehmen kann durch die Zelle selbst erfolgen. Es kann aber auch durch Hilfsstoffe oder Hilfsmittel vermittelt werden. Die Erfindung betrifft außerdem eine doppelsträngige Ribonukleinsäure, deren einer Strang S1 einen zum c-FLIP-Gen zumindest abschnittsweise komplementären Bereich aufweist.

Wegen der vorteilhaften Ausgestaltungen der erfindungsgemäßen Verwendungen, des erfindungsgemäßen Verfahrens und der erfindungsgemäßen doppelsträngigen Ribonukleinsäure wird auf die vorangegangenen Ausführungen verwiesen.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand der Zeichnungen beispielhaft erläutert. Es zeigt:

Fig. 1 den Einfluss einer Behandlung von SV80-Zellen mit die Expression des c-FLIP-Gens hemmender dsRNA auf die Empfindlichkeit dieser Zellen gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose und

Fig. 2 den Einfluss einer Behandlung von KB-Zellen mit die Expression des c-FLIP-Gens hemmender dsRNA auf die Empfindlichkeit dieser Zellen gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose.

KB-Zellen sind von der American Type Culture Collection (ATCC) unter der ATCC-Nr. CCL-17 zu beziehen. SV80-Zellen

können von der Firma CLS, 69123 Heidelberg, Deutschland unter der Bestellnummer 0345 HU (ATCC-Nr.: CRL-7725) bezogen werden.

5 Die eingesetzten dsRNAs weisen folgende, im Sequenzprotokoll mit SEQ ID NO:1 bis SEQ ID NO:9 bezeichneten Sequenzen auf:

dsRNA-F1, welche den Nukleotiden 472 bis 492 des c-Flip-L-Gens entspricht:

10 S2: 5'-GUGCCGGGAUGUUGCUAUAGA-3' (SEQ ID NO: 1)
S1: 3'-AACACGGCCUACAACGAUAU-5' (SEQ ID NO: 2)

dsRNA-F2, welche den Nukleotiden 908 bis 928 des c-Flip-L-Gens entspricht:

S2: 5'-CAAGGAGCAGGGACAAGUUAC-3' (SEQ ID NO: 3)
S1: 3'-AAGUUCCUCGUCCCUGUCAA-5' (SEQ ID NO: 4)

20 dsRNA-neo, welche zu einer Sequenz aus dem Neomycin-Resistenz-Gen komplementär ist:

S2: 5'-GAUGAGGAUCGUUUUCGCAUGA-3' (SEQ ID NO: 5)
S1: 3'-UCCUACUCCUAGCAAAGCGUA-5' (SEQ ID NO: 6)

25 dsRNA-F3, welche den Nukleotiden 472 bis 494 des c-Flip-L-Gens entspricht:

S2: 5'-GUGCCGGGAUGUUGCUAUAGA-3' (SEQ ID NO: 1)
30 S1: 3'-AACACGGCCUACAACGAUACU-5' (SEQ ID NO: 7)

dsRNA-F4, welche den Nukleotiden 908 bis 930 des c-Flip-L-Gens entspricht:

35 S2: 5'-CAAGGAGCAGGGACAAGUUAC-3' (SEQ ID NO: 3)
S1: 3'-AAGUUCCUCGUCCCUGUCAAUG-5' (SEQ ID NO: 8)

dsRNA-Kontrolle, welche zu einer Sequenz aus dem Neomycin-Resistenz-Gen komplementär ist:

5 S2: 5'-GAUGAGGAUCGUUUCGCAUGA-3' (SEQ ID NO: 5)
S1: 3'-UCCUACUCCUAGCAAAGCGUACU-5' (SEQ ID NO: 9)

Jeweils 10^7 SV80- und KB-Zellen pro ml sind mittels Elektroporation transient zweimal an aufeinanderfolgenden Tagen ohne
10 (Fig. 1 A, Fig. 2 A) oder mit 150 nmol/l dsRNA-neo (Fig. 1 B, Fig. 2 B), 150 nmol/l dsRNA-F1 (Fig. 1 C, Fig. 2 C), 150 nmol/l dsRNA-F2 (Fig. 1 D, Fig. 2 D) oder einem Gemisch von jeweils 75 nmol/l dsRNA-F1 und dsRNA-F2 (Fig. 1 E, Fig. 2 E) transfiziert worden. Bei der jeweils ersten Elektroporation
15 ist der Elektroporationslösung ein GFP (green fluorescent protein)-Expressionsplasmid zugesetzt worden, um die jeweili-ge Effizienz der Transfektion überprüfen zu können. Einen Tag nach der ersten Elektroporation sind die Zellen geerntet wor-
den. Mit einem Teil der Zellen ist die Transfektionseffizienz
20 mittels Messung der Fluoreszenzintensität durchflusszytome-trisch bestimmt worden. Die Fluoreszenzintensität dieser Zel-
len ist in den Figuren 1 A-E und 2 A-E jeweils im linken Feld durch eine durchgezogene dicke Linie dargestellt. Die im je-
weils gleichen Feld durch eine dünne Linie dargestellte Flu-
25 reszenzintensität ist diejenige der jeweils gleichen Zellen ohne ein GFP-Expressionsplasmid. Um eine möglichst hohe Transfektionseffizienz zu erreichen, ist der andere Teil der Zellen ein zweites mal jeweils mit derselben dsRNA wie am er-
sten Tag elektroporiert worden. Danach sind die Zellen in je-
weils 100 μ l Medium in die Vertiefungen von 96-Well-Platten
30 ausgesät worden. Am nächsten Tag sind die Zellen für jeweils 9 h inkubiert worden mit

35 - Flag-gekoppeltem löslichem und mit dem monoklonalen anti Flag-Antikörper M2 quervernetzten TRAIL ("TRAIL"), welches sowohl TRAIL-R1 als auch TRAIL-R2 stimulieren kann,

- agonistischem für TRAIL-R1 ("αTR1") und/oder TRAIL-R2 ("αTR2") spezifischem Kaninchen-Antiserum (1:500) oder
- 5 - Flag-gekoppeltem löslichem, wie oben angegeben quervernetztem TRAIL in Gegenwart von 20 µmol/l des Caspase-Inhibitors z-VAD-fmk ("TRAIL + ZVAD").

Schließlich wurde der Anteil vitaler Zellen mittels Kristall-
10 violett-Färbung bestimmt.

Aus den in den Figuren 1 und 2 dargestellten Ergebnissen ist
ersichtlich, dass die Transfektionseffizienz des GFP-
Expressionsplasmids in keiner der untersuchten Zelllinien
15 durch die dsRNA beeinflusst worden ist. dsRNA-F1 und dsRNA-F2
(Fig. 1 C-E, Fig. 2 C-E), nicht aber dsRNA-neo (Fig. 1 B,
Fig. 2 B) oder Elektroporation ohne dsRNA (Mock-Elektro-
poration) (Fig. 1 A, Fig. 2 A) haben KB- und SV80-Zellen si-
gnifikant für eine TRAIL-R1 und eine TRAIL-R2 vermittelte
20 Apoptose sensibilisiert. ZVAD hat die Sensibilisierung für
die TRAIL-induzierte Apoptose wieder aufgehoben. Das deutet
auf die Beteiligung von Caspasen hin (Fig. 1 C-E, Fig. 2 C-
E).

25 In einem weiteren nicht dargestellten Experiment sind KB-
Zellen durch die Behandlung mit dsRNA-F1 und dsRNA-F2 auch
für eine FasL- und TNF-induzierte Apoptose sensibilisiert
worden.

30 Die bei den bisher beschriebenen Experimenten eingesetzten
dsRNAs dsRNA-F1, dsRNA-F2 und dsRNA-neo weisen an beiden En-
den jeweils einen aus zwei Nukleotiden gebildeten Überhang
auf. Die Überhänge werden jeweils von den 3'-Enden der Strän-
ge S1 und S2 gebildet. Der doppelsträngige Bereich weist eine
35 Länge von 19 Nukleotidpaaren auf. Zusätzliche Experimente zur
Inhibition der FLIP-mRNA Expression wurden mit den dsRNAs

dsRNA-F3, dsRNA-F4 und dsRNA-Kontrolle durchgeführt. Bei diesen weist nur ein Ende der dsRNA einen aus zwei Nukleotiden gebildeten Überhang am 3'-Ende des S1-Stranges auf. Der doppelsträngige Bereich weist eine Länge von 21 Nukleotiden auf.
5 Eine quantitative Analyse hat gezeigt, dass dsRNA-F3 und dsRNA-F4 etwa genauso wirksam in der Inhibition der Expression eines GFP-Flip-Fusionsproteins sind wie dsRNA-F1 und dsRNA-F2.

Patentansprüche

1. Medikament zur Erhöhung der Wirksamkeit eines Rezeptor-vermittelt Apoptose in Tumorzellen auslösenden Arzneimittels, wobei das Medikament eine zu einer Hemmung der Expression eines c-FLIP-Gens mittels RNA-Interferenz geeignete doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) enthält.

5 2. Medikament nach Anspruch 1, wobei das Arzneimittel Apoptose mittels Tumor Nekrose Faktor oder Tumor Nekrose Faktor-verwandten Apoptose auslösenden Liganden, insbesondere TRAIL, auslöst.

10 3. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zum c-FLIP-Gen zumindest abschnittsweise komplementären, insbesondere aus weniger 15 als 25 aufeinanderfolgenden Nukleotiden bestehenden, Bereich aufweist.

20 4. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der komplementäre Bereich 19 bis 24, bevorzugt 20 bis 24, besonders bevorzugt 21 bis 23, insbesondere 22 oder 23, Nukleotide aufweist.

25 5. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Strang S1 weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, insbesondere 23, Nukleotide aufweist.

6. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zumindest ein Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.

30 7. Medikament nach Anspruch 6, wobei sich der einzelsträngige Überhang am 3'-Ende des Strangs S1 befindet.

8. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA nur an einem, insbesondere dem am 3'-Ende des Strangs S1 gelegenen, Ende einen einzelsträngigen Überhang aufweist.
- 5 9. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA neben dem Strang S1 einen Strang S2 aufweist.
10. Medikament nach Anspruch 9, wobei der Strang S1 eine Länge von 23 Nukleotiden, der Strang S2 eine Länge von 21 Nukleotiden und das 3'-Ende des Strangs S1 einen aus zwei Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist, während das am 5'-Ende des Strangs S1 gelegene Ende der dsRNA glatt ausgebildet ist.
11. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Strang S1 zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des c-FLIP-Gens komplementär ist.
12. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA aus dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 3 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 4 oder dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 7 oder dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 3 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 8 gemäß dem anliegenden Sequenzprotokoll besteht.
- 25 13. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA in dem Medikament in einer Lösung, insbesondere einem physiologisch verträglichen Puffer oder einer physiologischen Kochsalzlösung, von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Kapsid, einem Kapsoïd oder einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel umschlossen oder an einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel gebunden vorliegt.

14. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Medikament eine Zubereitung aufweist, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion oder Injektion, insbesondere zur intravenösen, intraperitonealen oder intratumoralen Infusion oder Injektion, geeignet ist.
5
15. Medikament nach Anspruch 14, wobei die Zubereitung, insbesondere ausschließlich, aus einem physiologisch verträglichen Lösungsmittel, vorzugsweise einer physiologischen Kochsalzlösung oder einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, und der dsRNA besteht.
10
16. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Medikament in mindestens einer Verabreichungseinheit vorliegt, welche die dsRNA in einer Menge enthält, die eine Dosierung von höchstens 5 mg, insbesondere höchstens 2,5 mg, bevorzugt höchstens 200 µg, besonders bevorzugt höchstens 100 µg, vorzugsweise höchstens 50 µg, insbesondere höchstens 25 µg, pro kg Körpergewicht und Tag ermöglicht.
15
17. Verwendung einer zur Hemmung der Expression eines c-FLIP-Gens mittels RNA-Interferenz geeigneten doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zur Herstellung eines Medikaments zur Erhöhung der Wirksamkeit eines Rezeptor-vermittelt Apoptose in Tumorzellen auslösenden Arzneimittels.
20
18. Verwendung einer zur Hemmung der Expression eines c-FLIP-Gens mittels RNA-Interferenz geeigneten doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zur Erhöhung der Wirksamkeit eines Rezeptor-vermittelt Apoptose in Tumorzellen auslösenden Arzneimittels.
25
19. Verwendung nach Anspruch 17 oder 18, wobei das Arzneimittel Apoptose mittels Tumor Nekrose Faktor oder Tumor Ne-

krose Faktor-verwandten Apoptose auslösenden Liganden, insbesondere TRAIL, auslöst.

20. Verwendung nach einem der Ansprüche 17 bis 19, wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zum c-FLIP-Gen zumindest abschnittsweise komplementären, insbesondere aus weniger als 25 aufeinanderfolgenden Nukleotiden bestehenden, Bereich aufweist.
5
21. Verwendung nach einem der Ansprüche 17 bis 20, wobei der komplementäre Bereich 19 bis 24, bevorzugt 20 bis 24, besonders bevorzugt 21 bis 23, insbesondere 22 oder 23, Nukleotide aufweist.
10
22. Verwendung nach einem der Ansprüche 17 bis 21, wobei der Strang S1 weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, insbesondere 23, Nukleotide aufweist.
15
23. Verwendung nach einem der Ansprüche 17 bis 22, wobei zumindest ein Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.
- 20 24. Verwendung nach Anspruch 23, wobei sich der einzelsträngige Überhang am 3'-Ende des Strangs S1 befindet.
- 25 25. Verwendung nach einem der Ansprüche 17 bis 24, wobei die dsRNA nur an einem, insbesondere dem am 3'-Ende des Strangs S1 gelegenen, Ende einen einzelsträngigen Überhang aufweist.
26
26. Verwendung nach einem der Ansprüche 17 bis 25, wobei die dsRNA neben dem Strang S1 einen Strang S2 aufweist.
27. Verwendung nach Anspruch 26, wobei der Strang S1 eine Länge von 23 Nukleotiden, der Strang S2 eine Länge von 21
30 Nukleotiden und das 3'-Ende des Strangs S1 einen aus zwei Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang auf-

weist, während das am 5'-Ende des Strangs S1 gelegene Ende der dsRNA glatt ausgebildet ist.

28. Verwendung nach einem der Ansprüche 17 bis 27, wobei der Strang S1 zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des c-FLIP-Gens komplementär ist.

29. Verwendung nach einem der Ansprüche 17 bis 28, wobei die dsRNA aus dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 3 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 4 oder dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 7 oder dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 3 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 8 gemäß dem anliegenden Sequenzprotokoll besteht.

15 30. Verwendung nach einem der Ansprüche 17 bis 29, wobei die dsRNA in einer Lösung, insbesondere einem physiologisch verträglichen Puffer oder einer physiologischen Kochsalzlösung, von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Kapsid, einem Kapsoïd oder einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel umschlossen oder an einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel gebunden vorliegt.

25 31. Verwendung nach einem der Ansprüche 17 bis 30, wobei die dsRNA in einer Zubereitung vorliegt, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion oder Injektion, insbesondere zur intravenösen, intraperitonealen oder intratumoralen Infusion oder Injektion, geeignet ist.

30 32. Verwendung nach Anspruch 31, wobei die Zubereitung, insbesondere ausschließlich, aus einem physiologisch verträglichen Lösungsmittel, vorzugsweise einer physiologischen Kochsalzlösung oder einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, und der dsRNA besteht.

33. Verwendung nach einem der Ansprüche 17 bis 32, wobei die dsRNA in einer Dosierung von höchstens 5 mg, insbesondere höchstens 2,5 mg, bevorzugt höchstens 200 µg, besonders bevorzugt höchstens 100 µg, vorzugsweise höchstens 50 µg, insbesondere höchstens 25 µg, pro kg Körbergewicht und Tag verwendet wird.
5
34. Verfahren zur Erhöhung der Wirksamkeit eines Rezeptor-vermittelt Apoptose in einer Tumorzelle auslösenden Wirkstoffs, wobei eine zu einer Hemmung der Expression eines c-FLIP-Gens mittels RNA-Interferenz geeignete doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) in die Tumorzelle eingeführt wird.
10
35. Verfahren nach Anspruch 34, wobei der Wirkstoff Tumor Nekrose Faktor oder Tumor Nekrose Faktor-verwandte Apoptose auslösende Liganden, insbesondere TRAIL, umfasst.
15
36. Verfahren nach Anspruch 34 oder 35, wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zum c-FLIP-Gen zumindest abschnittsweise komplementären, insbesondere aus weniger als 25 aufeinanderfolgenden Nukleotiden bestehenden, Bereich aufweist.
20
37. Verfahren nach einem der Ansprüche 34 bis 36, wobei der komplementäre Bereich 19 bis 24, bevorzugt 20 bis 24, besonders bevorzugt 21 bis 23, insbesondere 22 oder 23, Nukleotide aufweist.
25
38. Verfahren nach einem der Ansprüche 34 bis 37, wobei der Strang S1 weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, insbesondere 23, Nukleotide aufweist.
39. Verfahren nach einem der Ansprüche 34 bis 38, wobei zumindest ein Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.
30

40. Verfahren nach Anspruch 39, wobei sich der einzelsträngige Überhang am 3'-Ende des Strangs S1 befindet.

41. Verfahren nach einem der Ansprüche 34 bis 40, wobei die dsRNA nur an einem, insbesondere dem am 3'-Ende des Strangs S1 gelegenen, Ende einen einzelsträngigen Überhang aufweist.

5 42. Verfahren nach einem der Ansprüche 34 bis 41, wobei die dsRNA neben dem Strang S1 einen Strang S2 aufweist.

43. Verfahren nach Anspruch 42, wobei der Strang S1 eine Länge von 23 Nukleotiden, der Strang S2 eine Länge von 21 Nukleotiden und das 3'-Ende des Strangs S1 einen aus zwei Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist, während das am 5'-Ende des Strangs S1 gelegene Ende der dsRNA glatt ausgebildet ist.

15 44. Verfahren nach einem der Ansprüche 34 bis 43, wobei der Strang S1 zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des c-FLIP-Gens komplementär ist.

45. Verfahren nach einem der Ansprüche 34 bis 44, wobei die dsRNA aus dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 3 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 4 oder dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 7 oder dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 3 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 8 gemäß dem anliegenden Sequenzprotokoll besteht.

20 46. Verfahren nach einem der Ansprüche 34 bis 45, wobei die dsRNA in einer Lösung, insbesondere einem physiologisch verträglichen Puffer oder einer physiologischen Kochsalzlösung, von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Kapsid, einem Kapsoid oder einer polymeren

Nano- oder Mikrokapsel umschlossen oder an einer polymernen Nano- oder Mikrokapsel gebunden vorliegt.

47. Doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA), deren einer Strang S1 einen zum c-FLIP-Gen zumindest abschnittsweise 5 komplementären Bereich aufweist.

48. DsRNA nach Anspruch 47, wobei der komplementäre Bereich aus weniger als 25 aufeinanderfolgenden Nukleotiden bestehenden,

10 49. DsRNA nach Anspruch 47 oder 48, wobei der komplementäre Bereich 19 bis 24, bevorzugt 20 bis 24, besonders bevorzugt 21 bis 23, insbesondere 22 oder 23, Nukleotide aufweist.

15 50. DsRNA nach einem der Ansprüche 47 bis 49, wobei der Strang S1 weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, insbesondere 23, Nukleotide aufweist.

20 51. DsRNA nach einem der Ansprüche 47 bis 50, wobei zumindest ein Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.

52. DsRNA nach Anspruch 51, wobei sich der einzelsträngige Überhang am 3'-Ende des Strangs S1 befindet.

25 53. DsRNA nach einem der Ansprüche 47 bis 52, wobei die dsRNA nur an einem, insbesondere dem am 3'-Ende des Strangs S1 gelegenen, Ende einen einzelsträngigen Überhang aufweist.

54. DsRNA nach einem der Ansprüche 47 bis 53, wobei die dsRNA neben dem Strang S1 einen Strang S2 aufweist.

30 55. DsRNA nach Anspruch 54, wobei der Strang S1 eine Länge von 23 Nukleotiden, der Strang S2 eine Länge von 21 Nukleotiden und das 3'-Ende des Strangs S1 einen aus zwei

Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist, während das am 5'-Ende des Strangs S1 gelegene Ende der dsRNA glatt ausgebildet ist.

56. DsRNA nach einem der Ansprüche 47 bis 55, wobei der

5 Strang S1 zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des c-FLIP-Gens zumindest abschnittsweise komplementär ist.

57. DsRNA nach einem der Ansprüche 47 bis 56, wobei die dsRNA aus dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 und dem

10 Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 3 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 4 oder dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 7 oder dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 3 und dem 15 Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 8 gemäß dem anliegenden Sequenzprotokoll besteht.

58. DsRNA nach einem der Ansprüche 47 bis 57, wobei die dsRNA in einer Lösung, insbesondere einem physiologisch verträglichen Puffer oder einer physiologischen Kochsalzlösung, von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Kapsid, einem Kapsoid oder einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel umschlossen oder an einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel gebunden vorliegt.

59. DsRNA nach einem der Ansprüche 47 bis 58, wobei die dsRNA in einer Zubereitung vorliegt, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion oder Injektion, insbesondere zur intravenösen, intraperitonealen oder intratumoralen Infusion oder Injektion, geeignet ist.

60. DsRNA nach Anspruch 59, wobei die Zubereitung, insbesondere ausschließlich, aus einem physiologisch verträglichen Lösungsmittel, vorzugsweise einer physiologischen Kochsalzlösung oder einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, und der dsRNA besteht.

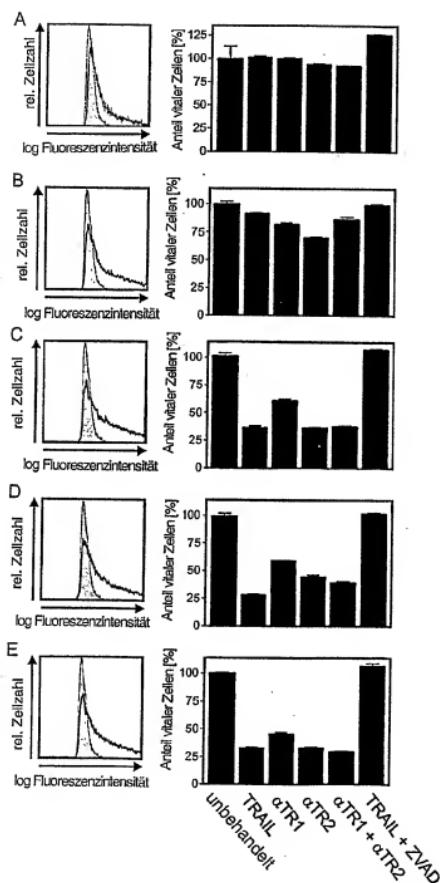


Fig. 1

2/2

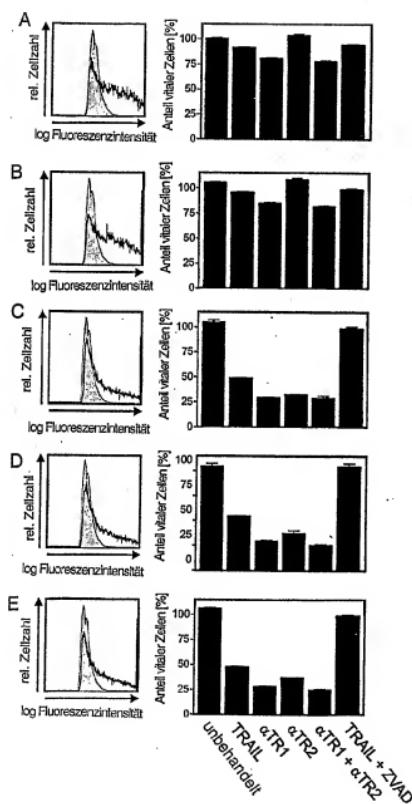


Fig. 2

1/2.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Ribopharma AG

5 <120> Medikament zur Erhöhung der Wirksamkeit eines Rezeptor-vermittelt Apoptose in Tumorzellen auslösenden Arzneimittels

10 <130> 422430EH

<140>

<141>

15 <160> 9

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 21

20 <212> RNA
<213> Homo sapiens

<400> 1

25 gugccgggau guugcuauag a

21

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

30 <213> Homo sapiens

<400> 2

uaauagcaaca ucccgccaca a

21

35 <210> 3

<211> 21

<212> RNA

40 <213> Homo sapiens

<400> 3

caaggagcag ggacaaguua c

21

45 <210> 4

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

50 <400> 4

aacuuuguccc ugcuccuuga a

21

55 <210> 5

<211> 21

<212> RNA

<213> Künstliche Sequenz

60 <220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sinn-Strang einer zu einer Sequenz des Neomycin-Resistenzgens

2/2

komplementären dsRNA

<400> 5
gaugaggaua guuuucgcaug a 21
5

<210> 6
<211> 21
<212> RNA
10 <213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Antisinn-Strang einer zu einer Sequenz des
15 Neomycin-Resistenzgens komplementären dsRNA

<400> 6
augcgaaacg auccucaucc u 21
20

<210> 7
<211> 23
<212> RNA
<213> Homo sapiens
25

<400> 7
ucuauagcaa cauccccggca caa 23
30

<210> 8
<211> 23
<212> RNA
<213> Homo sapiens
35

<400> 8
guaacuuguc ccugcuccuu gaa 23
40

<210> 9
<211> 23
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Antisinn-Strang einer zu einer Sequenz des
45 Neomycin-Resistenzgens komplementären dsRNA

<400> 9
ucauvgcgaaa cgauccuau ccu 23
50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat	Application No
PCT/EP	02/11968

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/11 A61K31/713 C12N15/88

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, EPO-Internal, PAJ, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 01 75164 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;TUSCHL THOMAS (DE); MASSACHUSETTS INSTITUTE) 11 October 2001 (2001-10-11) the whole document	1-60
Y	WO 00 44895 A (KREUTZER ROLAND ;LIMMER STEPHAN (DE)) 3 August 2000 (2000-08-03) the whole document	1-5, 13-22, 30-38, 47-50, 56,58-60
Y	WO 98 05770 A (ROTHBARTH KARSTEN ;JOSWIG GABY (DE); WERNER DIETER (DE); SCHUBERT) 12 February 1998 (1998-02-12) the whole document	1-5, 13-22, 30-38, 47-50, 56,58-60

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the International filing date

L document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step if the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the International search report

24 February 2003

13/03/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 951 epo nl,
Fax. (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Armandola, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat	Application No
PCT/EP 02/11968	

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, Y	WO 02 44321 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ; TUSCHI THOMAS (DE); ELBASIR SAYDA (DE);) 6 June 2002 (2002-06-06) the whole document ----	1-60
Y	ZAMORE PHILLIP D ET AL: "RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, vol. 101, no. 1, 31 March 2000 (2000-03-31), pages 25-33, XP002208683 ISSN: 0092-8674 the whole document ----	1-60
Y	BASS BRENDA L: "Double-stranded RNA as a template for gene silencing" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, vol. 101, no. 3, 28 April 2000 (2000-04-28), pages 235-238, XP002194756 ISSN: 0092-8674 the whole document ----	1-60
Y	WO 98 33883 A (TULARIK INC) 6 August 1998 (1998-08-06) page 6, line 1-14 ----	1-11, 13-15, 17-28, 30-32, 34-44, 46-56, 58-60
Y	AMBROS VICTOR: "Dicing up RNAs" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, vol. 293, no. 5531, 3 August 2001 (2001-08-03), pages 811-813, XP002183122 ISSN: 0036-8075 the whole document ----	1-5, 13-22, 30-38, 47-50, 56,58-60
Y	WO 98 44104 A (SCHROETER MICHAEL ; STEINER VERONIQUE (CH); FRENCH E LARS (CH); HAH) 8 October 1998 (1998-10-08) page 29, line 25 -page 30, line 15 ----	1-11, 13-15, 17-28, 30-32, 34-44, 46-56, 58-60

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interns I Application No
PCT/EP 02/11968

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y,P	BIN A L ET AL.: "The short splice form of Casper/c-FLIP is a major cellular inhibitor of TRAIL-induced apoptosis" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 510, no. 1-2, 2 January 2002 (2002-01-02), pages 37-40, XP004330501 ISSN: 0014-5793 cited in the application the whole document -----	1-11, 13-15, 17-28, 30-32, 34-44, 46-56, 58-60
A	ZHANG X.D., FRANCO A. ET AL.: "Relation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor and FLICE-inhibitory protein expression to TRAIL-induced apoptosis of melanoma." CANCER RES., vol. 59, 1 June 1999 (1999-06-01), pages 2747-2753, XP002230469 -----	
A	GRIFFITH T. S., CHIN W. A. ET AL.: "Intracellular regulation of trail-induced apoptosis in human melanoma cells." J. IMMUNOL., vol. 161, 1998, pages 2833-2840, XP002230470 -----	
T	SIEGMUND D. ET AL.: "Selective inhibition of FLICE-like inhibitory protein expression with small interfering RNA oligonucleotides is sufficient to sensitize tumor cells for TRAIL-induced apoptosis." MOLECULAR MEDICINE, vol. 8, no. 11, November 2002 (2002-11), pages 725-732, XP009005569 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal PCT/EP	Application No 02/11968
--------------------	----------------------------

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 0175164	A	11-10-2001	AU	3574402 A	11-06-2002	
			AU	4962201 A	15-10-2001	
			WO	0244321 A2	06-06-2002	
			WO	0175164 A2	11-10-2001	
			US	2002086356 A1	04-07-2002	
WO 0044895	A	03-08-2000	DE	19956568 A1	17-08-2000	
			AT	222953 T	15-09-2002	
			AU	3271300 A	18-08-2000	
			CA	2359180 A1	03-08-2000	
			WO	0044895 A1	03-08-2000	
			DE	10080167 D2	28-02-2002	
			DE	50000414 D1	02-10-2002	
			EP	1144623 A1	17-10-2001	
			EP	1214945 A2	19-06-2002	
WO 9805770	A	12-02-1998	DE	19631919 A1	12-02-1998	
			WO	9805770 A2	12-02-1998	
			EP	0918853 A2	02-06-1999	
WO 0244321	A	06-06-2002	AU	3574402 A	11-06-2002	
			AU	4962201 A	15-10-2001	
			WO	0244321 A2	06-06-2002	
			WO	0175164 A2	11-10-2001	
			US	2002086356 A1	04-07-2002	
WO 9833883	A	06-08-1998	US	6242569 B1	05-06-2001	
			AU	6143998 A	25-08-1998	
			WO	9833883 A1	06-08-1998	
			US	2002052474 A1	02-05-2002	
WO 9844104	A	08-10-1998	DE	19713393 A1	08-10-1998	
			AT	231552 T	15-02-2003	
			AU	750797 B2	25-07-2002	
			AU	7212998 A	22-10-1998	
			WO	9844104 A2	08-10-1998	
			EP	1258529 A2	20-11-2002	
			EP	0973901 A2	26-01-2000	
			JP	2002501371 T	15-01-2002	
			US	2002095030 A1	18-07-2002	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internati	je Aktenzeichen
PCT/EP 02/11968	

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 C12N15/11 A61K31/713 C12N15/88

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestpräzisierung (Klassifikationssystem und Klassifikationszeichen)
 IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestpräzisierung gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, EPO-Internal, PAJ, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENDE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 01 75164 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;TUSCHL THOMAS (DE); MASSACHUSETTS INST TE) 11. Oktober 2001 (2001-10-11) das ganze Dokument ---	1-60
Y	WO 00 44895 A (KREUTZER ROLAND ;LIMMER STEPHAN (DE)) 3. August 2000 (2000-08-03) das ganze Dokument ---	1-5, 13-22, 30-38, 47-50, 56,58-60
Y	WO 98 05770 A (ROTHBARTH KARSTEN ;JOSWIG GABY (DE); WERNER DIETER (DE); SCHUBERT) 12. Februar 1998 (1998-02-12) das ganze Dokument ---	1-5, 13-22, 30-38, 47-50, 56,58-60
		-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorie von angegebenen Veröffentlichungen :

*¹ Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

*² älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationale Anmeldeatum veröffentlicht worden ist

*³ Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen Veröffentlichung rechtsgemäß verhindert werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

*⁴ Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenlegung, eine Benutzung oder eine Verwendung oder ähnliche Maßnahmen bezieht

*⁵ Veröffentlichung, die vor dem internationale Anmeldeatum veröffentlicht wurde

*⁶ Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationale Anmeldeatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

*⁷ Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erneutem Wege Tatsachen bekannt sein

*⁸ Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als von erfindender Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Veröffentlichungen dieser Kategorie für einen Fachmann nahelegend ist

*⁹ Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Anmeldedatum des internationalen Recherchenberichte

24. Februar 2003

13/03/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5010 Patentklass 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
 Fax. (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Armandola, E

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internet	o Aktenzeichen
PCT/EP 02/11968	

C(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, Y	WO 02 44321 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;TUSCHL THOMAS (DE); ELBASHIR SAYDA (DE);) 6. Juni 2002 (2002-06-06) das ganze Dokument ---	1-60
Y	ZAMORE PHILLIP D ET AL: "RNA1: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, Bd. 101, Nr. 1, 31. März 2000 (2000-03-31), Seiten 25-33, XP002208683 ISSN: 0092-8674 das ganze Dokument ---	1-60
Y	BASS BRENDA L: "Double-stranded RNA as a template for gene silencing" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, Bd. 101, Nr. 3, 28. April 2000 (2000-04-28), Seiten 235-238, XP002194756 ISSN: 0092-8674 das ganze Dokument ---	1-60
Y	WO 98 33883 A (TULARIK INC) 6. August 1998 (1998-08-06) Seite 6, Zeile 1-14 ---	1-11, 13-15, 17-28, 30-32, 34-44, 46-56, 58-60
Y	AMBROS VICTOR: "Dicing up RNAs" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, Bd. 293, Nr. 5531, 3. August 2001 (2001-08-03), Seiten 811-813, XP002183122 ISSN: 0036-8075 das ganze Dokument ---	1-5, 13-22, 30-38, 47-50, 56,58-60
Y	WO 98 44104 A (SCHROETER MICHAEL ;STEINER VERONIQUE (CH); FRENCH E LARS (CH); HAH) 8. Oktober 1998 (1998-10-08) Seite 29, Zeile 25 -Seite 30, Zeile 15 ---	1-11, 13-15, 17-28, 30-32, 34-44, 46-56, 58-60
		-/-

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. & Aktenzeichen

PCT/EP 02/11968

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENDE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y,P	BIN A L ET AL: "The short splice form of Casper/c-FLIP is a major cellular inhibitor of TRAIL-induced apoptosis" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, Bd. 510, Nr. 1-2, 2. Januar 2002 (2002-01-02), Seiten 37-40, XP004330501 ISSN: 0014-5793 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1-11, 13-15, 17-28, 30-32, 34-44, 46-56, 58-60
A	ZHANG X.D., FRANCO A. ET AL.: "Relation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor and FLICE-inhibitory protein expression to TRAIL-induced apoptosis of melanoma." CANCER RES., Bd. 59, 1. Juni 1999 (1999-06-01), Seiten 2747-2753, XP002230469	
A	GRIFFITH T. S., CHIN W. A. ET AL.: "Intracellular regulation of trail-induced apoptosis in human melanoma cells." J. IMMUNOL., Bd. 161, 1998, Seiten 2833-2840, XP002230470	
T	SIEGMUND D. ET AL.: "Selective inhibition of FLICE-like inhibitory protein expression with small interfering RNA oligonucleotides is sufficient to sensitize tumor cells for TRAIL-induced apoptosis." MOLECULAR MEDICINE, Bd. 8, Nr. 11, November 2002 (2002-11), Seiten 725-732, XP009005569	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internatc Aktenzeichen

PCT/EP 02/11968

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 0175164	A	11-10-2001		AU 3574402 A AU 4962201 A WO 0244321 A2 WO 0175164 A2 US 2002086356 A1		11-06-2002 15-10-2001 06-06-2002 11-10-2001 04-07-2002
WO 0044895	A	03-08-2000		DE 19956568 A1 AT 222953 T AU 3271300 A CA 2359180 A1 WO 0044895 A1 DE 10080167 D2 DE 50000414 D1 EP 1144623 A1 EP 1214945 A2		17-08-2000 15-09-2002 18-08-2000 03-08-2000 03-08-2000 28-02-2002 02-10-2002 17-10-2001 19-06-2002
WO 9805770	A	12-02-1998		DE 19631919 A1 WO 9805770 A2 EP 0918853 A2		12-02-1998 12-02-1998 02-06-1999
WO 0244321	A	06-06-2002		AU 3574402 A AU 4962201 A WO 0244321 A2 WO 0175164 A2 US 2002086356 A1		11-06-2002 15-10-2001 06-06-2002 11-10-2001 04-07-2002
WO 9833883	A	06-08-1998		US 6242569 B1 AU 6143998 A WO 9833883 A1 US 2002052474 A1		05-06-2001 25-08-1998 06-08-1998 02-05-2002
WO 9844104	A	08-10-1998		DE 19713393 A1 AT 231552 T AU 750797 B2 AU 7212998 A WO 9844104 A2 EP 1258529 A2 EP 0973901 A2 JP 2002501371 T US 2002095030 A1		08-10-1998 15-02-2003 25-07-2002 22-10-1998 08-10-1998 20-11-2002 26-01-2000 15-01-2002 18-07-2002